

Patent
Attorney's Docket No. 026350-048

#12
AP
12/9/02

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

RECEIVED

DEC 05 2002

TECH CENTER 1600/2900

In re Patent Application of

Hiroshi SANO et al.

Application No.: 09/805,919

Filed: March 15, 2001

For: GENE WHICH EXHIBITS INDUCED
EXPRESSION BY STRESS

)
)
) Group Art Unit: 1638

)
) Examiner: Cynthia E. Collins

)
) Confirmation No.: 2905
)
)
)
)

CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

Japan Patent Application No. 2000-071655

Filed: March 15, 2000

In support of this claim, enclosed is a certified copy of said prior foreign application. Said prior foreign application referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

Date: December 3, 2002

By: _____
Robert G. Mukai
Registration No. 28,531

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620



PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy
of the following application as filed with this Office.

Date of Application : March 15, 2000

Application Number : Japanese Patent Application
No. 2000-071655

Applicant(s) : President of
NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

Certified on March 2, 2001

Commissioner,
Patent Office

Kozo OIKAWA (Sealed)

Certification No. 2001-3012732



日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2000年 3月15日

出願番号
Application Number:

特願2000-071655

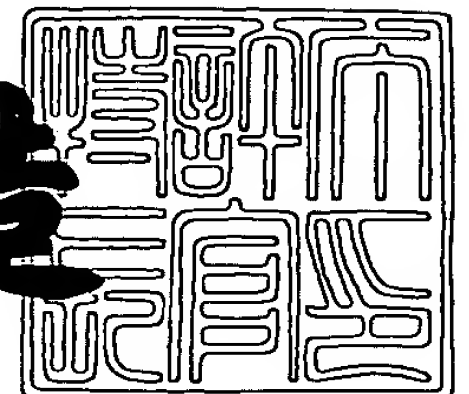
出願人
Applicant(s):

奈良先端科学技術大学院大学長

2001年 3月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3012732

【書類名】 特許願

【整理番号】 1999P173

【提出日】 平成12年 3月15日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 C12N 15/11

【発明の名称】 ストレスにより発現が誘導される遺伝子

【請求項の数】 6

【発明者】

 【住所又は居所】 奈良県生駒市鹿之台西 2 - 7 - 1 5

 【氏名】 佐野 浩

【発明者】

 【住所又は居所】 奈良県奈良市富雄元町 2 - 7 - 1 2 - 2 0 3

 【氏名】 草野 友延

【特許出願人】

 【識別番号】 598169457

 【氏名又は名称】 奈良先端科学技術大学院大学長 山田 康之

【代理人】

 【識別番号】 100059258

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 杉村 暁秀

【選任した代理人】

 【識別番号】 100072051

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 杉村 興作

【選任した代理人】

 【識別番号】 100098383

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 杉村 純子

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9900570

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ストレスにより発現が誘導される遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) または (b) に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号 1 に示す、アミノ酸番号 1 - 3 0 8 で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(b) ストレスにより発現が誘導され、(a) のアミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加された、ポリペプチド。

【請求項 2】 請求項 1 記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項 3】 請求項 1 記載のポリペプチドをコードし、配列表の配列番号 2 に示す、塩基番号 1 - 9 2 7 で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

【請求項 4】 以下の (c) または (d) に示す塩基配列からなることを特徴とし、タバコに由来する、遺伝子。

(c) 配列表の配列番号 3 に示す、塩基番号 1 - 1 2 1 0 で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(d) ストレスにより発現が誘導され、(c) の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加された、遺伝子。

【請求項 5】 請求項 2 から請求項 4 のいずれか一つの請求項記載の遺伝子を植物に導入することにより、植物にストレスに対する耐性を付与する方法。

【請求項 6】 請求項 2 から請求項 4 のいずれか一つの請求項記載の遺伝子を植物に導入することにより、植物にストレスに対する耐性を付与した、形質転換植物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、傷害、浸透圧、塩又は低温ストレスに応答して発現し、レセプター様蛋白質をコードする、新規遺伝子である C.7 遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】

将来の食糧危機が予想される事から、農業において効率良く作物を生産するための技術開発が求められている。食物生産において、種々の環境ストレスにより生産量が減少する事は大きな問題であり、環境ストレスに強い植物を作出することが求められている。

【0003】

その様な目的のためには、植物のストレスに対する自己防御機構に関する検討が必須である。自己防御機構は、大まかに（１）ストレスの認識、（２）ストレスの情報の伝達、（３）ストレスに対する対応、の３つの段階に分けられる。第二の情報の伝達の過程や第三の対応の過程については研究が進んでおり、それらの過程に関与する因子の同定が行われているが、第一のストレス認識過程や、その過程と情報伝達とのつながりについての知見は少ない。一般的に情報伝達の経路において、上流因子が複数の下流因子を制御していることが知られている。よって、上流であるこの認識過程を解析することにより、ストレス防御機構の下流に位置する伝達の経路や対応の経路において、一度に複数の因子を効率良く制御できる方法が得られる可能性が考えられる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

そこで本発明者らは、植物のストレス認識の過程に作用する因子を用いて、植物にストレス耐性を付与できないかと考えて検討を行った。即ち、ストレスの初期に応答する遺伝子の単離を目指し、その機能の解析を行う事が本発明の課題である。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthine) を用いて傷害ストレス、浸透圧ストレス、塩ストレス及び低温ストレス (4℃) を与えることにより、誘導される遺伝子を探索した。その結果、それらのストレスにより早期に、かつ一過性に誘導されるC7遺伝子を得た。即

ち、傷害45分後のタバコ葉よりRNAを抽出し、cDNAライブラリーを調製し、遺伝子断片C7-1をプローブとして陽性シグナルを得、本発明のC7遺伝子を単離して、C7遺伝子の全長の塩基配列を決定した。C7遺伝子の発現応答から考えて、当該遺伝子の産物は外部ストレスを認識するセンサーであり、下流のストレス応答遺伝子の発現制御に関与している可能性があり、植物に導入することにより傷害、浸透圧、塩ストレス又は低温ストレスに強い植物を作出することが期待される。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明は、配列表の配列番号3に示す、塩基番号1-1210で示される塩基配列からなることを特徴とする、タバコ由来のC7遺伝子である。C7遺伝子は、傷害ストレス、浸透圧ストレス、塩ストレス又は低温ストレスにより発現が誘導されるという性質を有する。C7遺伝子において、蛋白質をコードしているオープンリーディングフレームに相当する部分の塩基配列を、配列表の配列番号2に示す。配列表の配列番号2記載の塩基配列からなる遺伝子もまた、本発明の範囲内である。

【0007】

遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行う事により、天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとする事が可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。即ち、配列表の配列番号3に示す遺伝子の一部が欠失、置換若しくは付加された遺伝子とは、配列番号3に示す塩基配列と60%以上、好ましくは70%以上、更に好ましくは80%以上の相同性を有する遺伝子である。その様な遺伝子も、上述したストレスにより誘導されるというC7遺伝子の特徴を有する限り、本発明の範囲内である。

【0008】

更に本発明は、配列表の配列番号 1 に示す、アミノ酸番号 1 - 3 0 8 で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、タバコ由来の C 7 ポリペプチドである。当該ポリペプチドは、配列表の配列番号 2 記載の塩基配列によりコードされるポリペプチドである。配列番号 1 に示すポリペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチドとは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列と 6 0 % 以上、好ましくは 7 0 % 以上、更に好ましくは 8 0 % 以上の相同性を有するポリペプチドである。その様なポリペプチドも、傷害ストレス、浸透圧ストレス、塩ストレス又は低温ストレスにより誘導されるという C 7 ポリペプチドの特徴を有する限り、本発明の範囲内である。

【 0 0 0 9 】

C 7 遺伝子を植物に導入して形質転換を行う方法、当該 C 7 遺伝子を導入して得た形質転換した植物もまた、本発明の範囲内である。本発明の C 7 遺伝子は、上述した様に傷害ストレス、塩ストレス、浸透圧ストレス又は低温ストレスにより誘導される遺伝子であり、植物の自己防御に関与している。そのために、当該遺伝子を植物に導入する事により、それらのストレスに対する耐性を付与する事ができる。本発明のストレス誘導遺伝子を導入する植物の例としては、ユリ、イネ、トウモロコシ、アスパラガス、コムギ等の単子葉植物、またシロイヌナズナ、タバコ、ニンジン、ダイズ、トマト、ジャガイモ等の双子葉植物が挙げられる。

【 0 0 1 0 】

形質転換体の作製方法としては、本技術分野において知られている通常の方法を用いる事ができる。本発明において使用可能なベクターはプラスミドベクターであり、例えば実施例で使用した p B I 1 2 1 及び p B I 2 2 1 等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。そのようなベクターを、例えばアグロバクテリウム菌に導入して、カルス又は幼植物に感染させることにより、形質転換植物を作製する事が可能であり、更に、そのような形質転換植物に由来する種子を得る事が可能である。本発明の植物遺伝子を植物に導入する形質転換法はアグロバクテリウム法に限定されるものではなく、パーティクルガン法、電気穿孔法等の方法を用いる事も可能である。

【 0 0 1 1 】

【実施例】

(C 7 遺伝子断片の単離)

蛍光ディファレンシャルディスプレイ (FDD) 法を用いて、傷害ストレスの初期応答に関与する遺伝子の単離を行った。FDDにより、傷害初期に一過性に発現する遺伝子断片C 7が得られた。C 7 遺伝子断片のバンドをゲルから切り出して溶出し、PCR法により増幅させてpGEM-T easyベクター (プロメガ) にクローニングし、クローンC 7-1を得た。その様にして得られたクローン (C 7-1) をプローブに、サザンハイブリダイゼーションを行った。FDDのバンドに結合していることから、上記クローン (C 7-1) がC 7断片であることが分かった。DNAシーケンシングにより、その断片338塩基対の配列を決定した。

【 0 0 1 2 】

(サザンハイブリダイゼーション)

上述した方法により得られたクローン (C 7-1) をプローブとして用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った。PCR法により増幅したDNA断片を、1%アガロース/0.5×TBEを用いてゲル電気泳動を行った。エチジウムブロマイド水溶液で染色し、トランスイルミネーター上で反応生成物の確認を行った。DNA断片の回収は、Prep-A-Gene-DNA精製キット (バイオラッド) のプロトコールに従って回収した。BcaBESTラベリングキット (タカラ) を用いてDNA断片の放射標識を行い、標識DNAプローブを作成した。メンブレンを容器に入れてハイブリダイゼーション溶液を加え、65℃、1時間以上プレハイブリダイゼーションを行った。容器に作成した標識DNAプローブを用いて、65℃で16時間以上ハイブリダイゼーションを行い、洗浄後バイオイメージアナライザーで解析を行った。

【 0 0 1 3 】

(ノーザンハイブリダイゼーション)

メンブレンを容器に入れてハイブリダイゼーション溶液を加え、42℃、1時間以上プレハイブリダイゼーションを行った。容器に作成した放射標識DNAプ

ローブを用いて、42℃で16時間以上ハイブリダイゼーションを行い、洗浄後バイオイメージアナライザーで解析を行った。

【0014】

(cDNAライブラリーの作成)

(RNAの抽出)

酸性グアニジウムチオシアネート／フェノール／クロロフォルム法（AGPC法）により、傷害ストレス45分後のタバコ葉よりRNAの抽出を行った。健全タバコ葉をハサミで切って5cm²の切片とし、蒸留水の上に浮かべた。45分後に葉切片を回収し、液体窒素で凍らせた。1g相当量のタバコ葉組織を乳鉢に入れ、液体窒素で凍らせながら乳鉢で粉末状になるまで良く磨砕した。ディネイチャリングバッファーと2-メルカプトエタノールの入ったチューブに粉末を入れ、ポリトロンでホモジェネートした。2M NaOAc (pH4.0) 1mlを加え攪拌後、酸性フェノール10mlを加え攪拌した。次に、クロロフォルム／イソアミルアルコール（IAA）（49：1）2mlを加え攪拌し、氷上で15分間静置した。遠心して水層を移し、イソプロパノール10mlを加え、10分間室温で静置した。遠心し、ジエチルピロカーボネート（DEPC）処理水600μlで溶解し、遠心チューブに移した。フェノール／クロロフォルム／IAA（25：24：1）600μlを加え攪拌し、遠心した後、水層を回収した。この操作を2回繰り返した。8M LiCl 200μlを加え、4℃、4時間静置した。遠心し、上清を除いた。70%エタノール1mlを加え、遠心し上清を除き、スピードバックで乾燥させた。沈殿物をDEPC処理水50μlに溶解し、全RNA抽出物とした。

【0015】

(mRNAの精製)

mRNA精製キット（ファルマシア）のプロトコールに従って精製した。全RNA抽出物溶出バッファー1mlに再溶解した。カラムを再懸濁し、ファルコンチューブを垂直に立て高塩バッファー1mlを重力のまま溶出させた。この操作を2回繰り返した。全RNAサンプルを65℃、5分間熱変性させた後、直ちに氷冷した。サンプルバッファー0.2mlをカラムにアプライし重力のまま溶出

させた後、遠心した。高塩バッファーを250 μ l アプライし、遠心した。この操作を3回繰り返した。低塩バッファーを250 μ l アプライし、遠心した。この操作を3回繰り返した。ファルコンチューブからカラムを取り出し、溶出物を除いた。再度カラムを垂直に立て、65℃に保温しておいた溶出バッファー250 μ l をアプライし、遠心してmRNA画分を回収した。この操作を4回繰り返した。上記スパンカラムクロマトグラフィーの操作を2回繰り返した。回収したmRNA画分にサンプルバッファー100 μ l、グリコーゲン溶液10 μ l、氷冷100%エタノール2.5 mlを加え、-20℃、2時間以上静置した。遠心し上清を取り除き、溶出バッファー1 mlに溶解し、これを精製mRNAサンプルとした。

【0016】

(ファーストストランドの合成)

精製mRNAサンプル5 μ g分をDEPC処理水11 μ lに溶解し、リンカープライマー2 μ lを加え70℃、5分間保温後、直ちに氷冷した。5×ファーストストランドバッファー10 μ l、ファーストストランドメチルヌクレオチド混合液3 μ l、0.1M DTT 5 μ l、RNaseブロックリボヌクレオチドインヒビター1 μ l、DEPC処理水12 μ lを順番に加え混ぜ37℃、2分間保温した。SUPERSCRIPT IIリバーstransクリプターゼを加え混ぜ、1時間反応させた後、氷冷した。

【0017】

(セカンドストランドの合成)

ZAP-cDNA合成キット(ストラタジーン)のプロトコールに従った。ファーストストランド反応液50 μ lに、10×セカンドストランドバッファー20 μ l、セカンドストランドヌクレオチド混合液6 μ l、蒸留水111 μ l、RNaseH 2 μ l、DNAポリメラーゼI 12 μ lを順番に加え混ぜ、16℃、2.5時間反応させた後、氷冷した。

【0018】

(cDNA末端の平滑末端化)

セカンドストランドバッファー反応液200 μ lに、Blunting dN

TP 混合液 $23\mu\text{l}$ 、クローン化した Pfu DNA Polymerase $2\mu\text{l}$ を加え、 72°C 、30 分間反応させた。フェノール/クロロフォルム $200\mu\text{l}$ を加えて攪拌し、遠心して水層を回収した。クロロフォルム $200\mu\text{l}$ を加えて攪拌し、遠心して水層を回収した。3M 酢酸ナトリウム $20\mu\text{l}$ と 100% エタノール $400\mu\text{l}$ を加え、 -20°C で一晩放置した。遠心し、上清を除き、70% エタノール $400\mu\text{l}$ を加えた。遠心し上清を除き、スピードバックで乾燥させた。沈殿物を EcoRI アダプター溶液 $9\mu\text{l}$ に溶解し、そのうち $1\mu\text{l}$ を 2nd Strand 合成確認用に -20°C で保存した。

【0019】

(EcoRI アダプターのライゲーション)

上記で残った反応液 $8\mu\text{l}$ に、10×リガーゼバッファー $1\mu\text{l}$ 、10mM rATP $1\mu\text{l}$ 、T4 DNA リガーゼ $1\mu\text{l}$ を加え混ぜ、 8°C 、2 日間反応させた。

【0020】

(EcoRI 末端のリン酸化)

上記反応物 $11\mu\text{l}$ を 70°C 、30 分間保温した後、室温に 5 分間放置した。10×リガーゼバッファー $1\mu\text{l}$ 、10mM rATP $2\mu\text{l}$ 、蒸留水 $6\mu\text{l}$ 、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ $0.7\mu\text{l}$ を加え混ぜ、 37°C 、30 分間反応させた。70℃、30 分間保温した後、室温に 5 分間放置した

【0021】

(XhoI 切断)

上記反応物 $20.7\mu\text{l}$ に、XhoI バッファー $28\mu\text{l}$ 、XhoI $3\mu\text{l}$ を加え混ぜ、 37°C 、1.5 時間反応させた。室温で冷却し、10×STE バッファー (1M NaCl、200mM Tris-HCl pH7.5、100mM EDTA) $5\mu\text{l}$ を加え混ぜた。

【0022】

(サイズ分解)

cDNA Spun Columns Size Sep 400 Spun Columns (ファルマシア) のプロトコールに従った。カラムを STE バッ

ファー2mlで再懸濁し、溶出させた。この操作を2回行った。ファルコンチューブを垂直に立てて、遠心した。溶出液を回収するための遠心チューブをファルコンチューブ内にセットし、cDNAサンプルをカラムの中心にアプライした。遠心し、cDNA分画液56.7 μ lを回収した。STEバッファーで全体量を200 μ lにした。フェノール/クロロホルム200 μ lを加えて攪拌し、遠心して水層を新しい遠心チューブに回収した。クロロホルム200 μ lを加えて攪拌し、遠心して水層を新しい遠心チューブに回収した。100%エタノール400 μ lを加え、-20℃、一晚放置した。遠心し、上清を除き、スピードバックで乾燥させた。蒸留水5 μ lに溶解し、cDNAサンプル(10ng/ μ l)とした。

【0023】

(cDNAのUni-ZAP XRベクターアームへのライゲーション)

上記cDNAサンプル2.5 μ lに、10×リガーゼバッファー0.5 μ l、10mM rATP 0.5 μ l、Uni-ZAP XRベクター1 μ l、T4 DNAリガーゼ0.5 μ lを加え混ぜ、4℃、2日間反応させた。

【0024】

(パッケージング)

MaxPlax Lambda Packaging Extract kit (EPICENTRE TECHNOLOGIES)のプロトコールに従った。上記ライゲーションサンプル5 μ lを65℃、15分間保温した後、室温、5分間放置した。パッケージングエキストラクトを融解し、ライゲーションサンプル5 μ lを加え混ぜ、21.9℃、110分間保温した。SMバッファー(5.8g NaCl、2.0g 硫酸マグネシウム7水和物、50ml Tris-HCl pH7.5、2%ゼラチン5ml) 500 μ l、クロロホルム25 μ lを穏やかに混ぜ、遠心し、上清450 μ lをパッケージング産物として4℃で保存した。

【0025】

(C7全長鎖のスクリーニング)

(プレーティング)

LB-Tet (12.5 μ g/ml) プレートにストリークしておいた宿主大腸菌XL1-Blue MRFをLBプレート3mlでOD₆₀₀ = 0.5まで37℃で震盪培養した。パッケージング産物100 μ lと、宿主菌100 μ lを混ぜ、37℃、15分間培養した。48℃に保温しておいたLBトッパアガー（液体LB培地に0.7%アガロースを加える）3mlに混合培養液を入れ混ぜた後、直ちにLBプレートにプレーティングした。37℃で一晩培養した。

【0026】

（一次スクリーニング）

上記プレートを、30分間風乾した。プレートを氷上で冷やしながらナイロンメンブレン（ハイボンド-N⁺、アマシャム）をはりつけ、2分間放置した。メンブレンをはがし、変性バッファー（0.5M水酸化ナトリウム、1.5M塩化ナトリウム）に2分間浸した。更に、中和バッファー（0.5M Tris-HCl pH7.5、1.5M NaCl）に5分間浸した。20×SSCバッファー（175.3g塩化ナトリウム、88.2gクエン酸ナトリウム）に30秒間浸した後、キムタオル上で風乾させた。UVクロスリンカーで70000 μ J/cm²にてDNAをメンブランにクロスリンクさせた。前述のノーザンハイブリダイゼーションと同様にプレハイブリダイゼーション、遺伝子断片C7-1をプローブとしたハイブリダイゼーション、洗浄及びシグナルの検出を行った。

【0027】

（二次スクリーニング）

一次スクリーニングで得られた陽性プラークをチップを付けたピペットで打ち抜き、SMバッファー500 μ lに懸濁し、クロロフォルム25 μ lを加えて攪拌した。前述の通り、プレーティング、メンブレンへのクロスリンク、プレハイブリダイゼーション、遺伝子断片C7-1をプローブとしたハイブリダイゼーション、洗浄及びシグナルの検出を行った。

【0028】

（インビボイクシジョン）

前述した大腸菌XL1-BlueMRFと、LB-Km (50 ng/ml) プレートにストリークしておいた大腸菌SOLRをLB3mlで37℃で一晩振盪

培養した。二次スクリーニングで得られた目的のプラークを前述同様に打ち抜き、SMバッファーに懸濁した。クロロフォルム $20\mu\text{l}$ を加えて攪拌し、時々攪拌させながら1～2時間室温に放置した。これを、ファージストック1とした。大腸菌XL1-BlueMRF株 $100\mu\text{l}$ 、ファージストック1 $50\mu\text{l}$ 、ExAssist helper phage $1\mu\text{l}$ を試験管内で混合し、 37°C 、15分間放置した。LB 1ml を加え、 37°C 、2～3時間振盪培養した。混合培養液を 1.5ml 遠心チューブに移し、 70°C 、20分間保温した後、室温に戻した。遠心し上清を回収し、ファージストック2とした。 1.5ml 遠心チューブで大腸菌SOLR株 $200\mu\text{l}$ 、ファージストック2 $50\mu\text{l}$ を混合し、15分間放置した。 $50\mu\text{l}$ をLB-Amp ($50\mu\text{g}/\text{ml}$)プレートにプレーティングし、 37°C で一晩培養した。

【0029】

(プラスミドの確認)

コロニーのプラスミドの確認は、コロニーPCR法を用いて行った。T3プライマー (20mer 、 $5'-\text{AATTAACCCTCACTAAAGGG}-3'$ 、 $3.2\mu\text{M}$ 、 $1.5\mu\text{l}$)、T7プライマー (22mer 、 $5'-\text{GTAATACGACTCACTATAGGGC}-3'$ 、 $3.2\mu\text{M}$ 、 $1.5\mu\text{l}$)、dNTPs (2.5mM 、 $1.6\mu\text{l}$)、 $10\times\text{PCR}$ バッファー $2\mu\text{l}$ 、DNAポリメラーゼ (タカラTaq、 $5\text{U}/\mu\text{l}$ 、 $0.1\mu\text{l}$)、蒸留水 $13.3\mu\text{l}$ 、及び爪楊枝で突いたコロニーを 0.2ml PCRチューブに入れ、タッピングで良く混ぜた。PCR装置で増幅反応を行った。反応後、 1% アガロース/ $0.5\times\text{TBE}$ ゲルを用いて電気泳動を行った。エチジウムブロマ이드水溶液で染色し、トランスイルミネーター上で反応生成物の確認を行った。以下、コロニーPCR法は場合に応じてプライマー、伸長反応時間を変更して行った。

コロニーPCRの条件

95°C 1分

94°C 30秒、 55°C 30秒、 72°C 2分 2サイクル

72°C 7分、 4°C 、無限大

【0030】

(アルカリミニプレップ法によるプラスミドの調製)

LB-Amp 3 ml に単一コロニーを植菌し、37℃で一晩培養した。1.5 ml チューブに培養液を入れ、遠心して集菌した。上清を除いて菌体を溶液 I (50 mM グルコース、20 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0) 100 μ l に懸濁した。溶液 II (0.2 N NaOH、1% SDS) 200 μ l を加え緩やかに混ぜ、氷上、5 分間静置した。溶液 III (3 M 酢酸カリウム、pH 4.8) 150 μ l を加え緩やかに混ぜ、氷上、5 分間静置した。遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに回収した。フェノール/クロロフォルム 450 μ l を加え 5 分間振り混ぜた。遠心し、水層を新しい 1.5 ml 遠心チューブに回収した。100% エタノール 900 μ l を加え、室温、3 分間放置した。遠心し、上清を除いた。70% エタノール 900 μ l を加え、上清を除き、スピードバックで乾燥させた。TE 50 μ l に溶解し、RNase (1 mg/ml) を 1 μ l 加え、30 分間放置した。以下、アルカリプレップ法によるプラスミドの調製は、上記の方法で行った。

【0031】

(制限酵素処理によるインサートの確認)

調製プラスミド溶液 2 μ l、ユニバーサルバッファ H (タカラ、2 μ l)、EcoRI (タカラ、0.1 μ l)、XhoI (タカラ、0.1 μ l)、蒸留水 15.8 μ l を遠心チューブに入れ、37℃、1 時間反応させた。反応後、1% アガロース/0.5 \times TBE を用いてゲル電気泳動を行った。エチジウムブロマイド水溶液で染色し、トランスイルミネーター上で反応生成物の確認を行った。以下、制限酵素処理によるインサートの確認は場合に応じて制限酵素を変更し、上記の方法で行った。

【0032】

(PEG によるプラスミドの調製)

アルカリミニプレップ法によって調製したプラスミド溶液 50 μ l に、PEG/NaCl [1.6 M/13% (w/v)] 50 μ l を加え混ぜ、4℃で一晩静置した。遠心 (15000 rpm、20 分、4℃) し上清を除き、70% エタノール 250 μ l を加え遠心した。上清を除き、スピードバックで乾燥させ、TE

40 μ lに溶解した。以下、PEGによるプラスミドの調製は上記の方法で行った。

【0033】

(C7全長鎖cDNA塩基配列の決定)

0.2ml PCRチューブにBigDye Terminator Ready Reaction Mixture (PEアプライドシステム、8 μ l)、T7あるいはT3プライマー(3.2 μ M、1 μ l)、PEGによって調製したプラスミド(約500 ng分)を入れ、全量が20 μ lになるように蒸留水を加えた。PCR装置で反応させた後、1.5ml遠心チューブに全量を移し、3M NaOAc (pH5.2) 2 μ l、氷冷100%エタノール50 μ lを加え、-80℃で20分間以上放置した。遠心し上清を除き、70%エタノール250 μ l加え、遠心した。スピードバックで乾燥させた後、Template Suppression Reagent (TSR、PEアプライドシステム) 12 μ lに溶解した。95℃、3分間変性させた後、直ちに氷冷した。

PCRの条件

96℃ 10秒、50℃ 5秒、60℃ 4分 25サイクル

4℃、無限大

【0034】

更に、蛍光キャピラリーシーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, PEアプライドシステム) により塩基配列を決定した。シーケンスに用いたプライマーは以下の様である。

C7F1: (29mer、5'-GCTCCTATCAATTCGTCACAGTATATTCC-3'、
3.2 μ M、1 μ l)

C7F2: (25mer、5'-CCAGGCATTTTCATCAAACAAGTTTCG-3'、
3.2 μ M、1 μ l)

C7R1: (22mer、5'-CTCCACCTATTCCTATACCGCC-3'、
3.2 μ M、1 μ l)

C7R2: (26mer、5'-GCACTCACCCCCACGACTCCGGTCGC-3'、
3.2 μ M、1 μ l)

【 0 0 3 5 】

(C 7 遺伝子産物の機能解析)

C 7 遺伝子の全長の配列を決定したところ、全長は 1 2 1 0 b p であり、 3 0 8 個のアミノ酸をコードしていた (図 1) 。 B L A S T でホモロジーサーチを行ったところ、 C 7 のアミノ酸配列はレセプター様蛋白質と有意な相同性を示した。また、 C 7 タンパク質の細胞内局在を P S O R T で予測した。その結果、 2 4 番目のアミノ酸で開裂する疎水性シグナル、ヘリックスを持った単一の膜貫通領域、親水性の細胞質領域を有していた。 C 7 遺伝子産物の予測される機能領域と、疎水性プロファイルを図 2 に示す。

【 0 0 3 6 】

(C 7 蛋白質とレセプター様キナーゼとの相同性)

上述した様に、ホモロジーサーチ及び構造予測により、 C 7 遺伝子がコードする蛋白質は、膜貫通型の蛋白質であることが示唆された。更に、データベース検索を行ったところ、 C 7 蛋白質はレセプター様キナーゼ (R L K) と有意な相同性を有している事が示された。コムギ L r 1 0 耐病遺伝子座産物である L R K 1 0 と相同性のある領域のアミノ酸アラインメントを、図 3 に示す。図 3 において、 3 つの蛋白質のアミノ酸が一致している部分を四角で囲み、相同性が高い部分を黒抜きで示す。

【 0 0 3 7 】

(植物細胞内での局在)

更に、 C 7 - G F P (G r e e n F l u o r e s c e n t P r o t e i n) 融合蛋白質を用いて植物細胞内での局在を調べた。 C 7 / G F P プラスミドを金粒子にコーティングし、植物組織 (タマネギ) にパーティクルガン法により導入した。一晩インキュベートをした後に蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、 C 7 - G F P 融合蛋白質が原形質膜上に局在することがわかった (図 4) 。図 4 において、タマネギ表皮細胞で一過的に発現した G F P (左) と、 C 7 - G F P 融合蛋白質の蛍光シグナルを示す。

【 0 0 3 8 】

これまで述べた C 7 蛋白質の特徴より、タイプ I 型の膜貫通型蛋白質であるこ

とが示唆された。しかし、レセプター様キナーゼと相同性を有するのに関わらず、C7蛋白質にはキナーゼ配列を持つ細胞質領域は存在していなかった。現在知られているストレスセンサーが二量体を形成し、他の蛋白質と相互作用して細胞内の下流に情報を伝達していることから、C7蛋白質は二量体を形成する浸透圧センサーで、細胞内にある何らかの標的蛋白質と相互作用することにより情報を伝達し、下流に存在するその他のストレス応答遺伝子の発現制御に関与する、という可能性が考えられる。

【0039】

(ストレス応答におけるC7遺伝子発現の特性)

ストレス応答に対するC7遺伝子の発現の特性を、ノーザンハイブリダイゼーションにより調べた。傷害を受けた葉においてC7遺伝子発現の経時変化を検討したところ、C7遺伝子は10分程度で発現し始め、30分で発現が最大となり、4時間後には発現がなくなるという、一過性の発現を示した(図5)。図5の下段に、構成的に発現するコントロールであるアクチンの結果を示す。このように、C7遺伝子は傷害ストレス応答の初期段階において、早期にかつ一過性に発現しており、これは植物にとって重要な遺伝子であることを示している。

【0040】

C7遺伝子の発現に対する、細胞内の水環境の影響を検討した。そこで、1.2%NaCl溶液で塩ストレスを、500mMマンニトール溶液で浸透圧ストレスを与えて、それらの影響を検討した。C7遺伝子の発現が機械的な傷ストレスに影響されないように、健全葉を植物体から切り離して4時間水に付けた後、それぞれのストレス溶液に浸け直した。その結果、塩ストレス、浸透圧ストレス共に、ストレス処理後45分で一過的な発現があった。ノーザンハイブリダイゼーションにより検出した、1.2%NaCl処理の塩ストレスによるmRNAレベルの変化を図6に、500mMマンニトール溶液処理の浸透圧ストレスによるmRNAレベルの変化を図7に、それぞれ示す。図6及び図7において、構成的に発現しているコントロールである、rRNAとアクチンの検出を行った結果を、それぞれ下段に示す。即ち、水分環境ストレスに対しても、C7遺伝子の発現増加が認められた。更に、C7遺伝子の乾燥や低温に対する応答を調べた。塩、浸

透圧ストレスと同様に健全葉を植物体から切り離して4時間水に付けた後、4℃で低温ストレスを与えた。C7遺伝子は低温ストレスにより誘導されたが、乾燥ストレスによりC7遺伝子の発現の誘導は見られなかった。

【0041】

【発明の効果】

本発明により、傷害、浸透圧、塩又は低温ストレスに応答して発現し、レセプター様蛋白質をコードする、新規遺伝子であるC7遺伝子、及び当該遺伝子がコードするポリペプチドが与えられた。

【0042】

【配列表】

<110>出願人氏名：奈良先端科学技術大学院大学長

<120>発明の名称：ストレスにより発現が誘導される遺伝子

<160>配列の数：3

<210>配列番号：1

<211>配列の長さ：308

<212>配列の型：アミノ酸

<213>起源：Nicotiana tabacum cv. Xanthi nc葉

<400>配列

MLTRGLLFAC VLLLVTLISS SKAQDISQCV PSSCGDIQIK FPFRLRTDPE HCGRRGYELD	60
CQNNQTVFNY KSRIFDVQEI NYRSYSIRLL DPGLNDQREN CTVFPNHRAS YDAMTSQIFE	120
WVRVNNDINY VNCLAPINSS QYIPTSFC SK NSTGFSYLV I REILQASDLA GGCRVETVAW	180
SSAPGISSNK SSTLSSTHQG LAYGFELSWK RNLLCRNCDR SRGGECTIEE NSDRATCRYW	240
CKEDIHVSKL TFRCKVEYYS VYVLFFGGIG IGGVLAXRFL LGIPILIAAV VWQCKRRNLH	300
TSSDEQNC	308

< 2 1 0 > 配列番号 : 2

< 2 1 1 > 配列の長さ : 9 2 7

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : N i c o t i a n a t a b a c u m c v . X a n t h i
n c 葉

< 4 0 0 > 配列

ATGTTGACAA GAGGGCTGCT TTTCGCTTGT GTTTTGTTAC TTGTGACACT CATAAGCAGT	60
TCTAAAGCGC AGGATATTTT TCAATGTGTC CCTTCTTCCT GCGGTGATAT TCAAATAAAA	120
TTTCCCTTCC GACTGAGGAC TGATCCCGAG CATTGTGGTA GACGCGGATA TGAGCTCGAT	180
TGCCAGAACA ACCAAACCGT GTTCAATTAC AAATCCAGAA TTTTCGACGT ACAGGAAATT	240
AACTACAGAA GCTACTCAAT AAGGCTACTT GATCCTGGCC TAAATGATCA GAGAGAAAAT	300
TGCACAGTTT TTCCAAATCA CAGGGCAAGT TATGATGCCA TGA CTAGCCA AATCTTTGAA	360
TGGGTTCGTG TTAACAATGA TATCAACTAT GTCAACTGTC TAGCTCCTAT CAATTCGTCA	420
CAGTATATTC CTACAAGTTT TTGTAGCAAA AATTCAACGG GTTTTAGCTA CCTTGTCATA	480
AGAGAAATAT TGCAAGCTTC GGATTTGGCT GCGGGCTGTA GGGTTGAAAC TGTTGCATGG	540
TCCTCTGCTC CAGGCATTTT ATCAAACAAG TCGTCTACGT TATCAAGCAC ACATCAAGGC	600
CTGGCTTATG GGTTTGAGCT TTCTTGGAAG CGTAATCTGT TATGTAGAAA TTGCGACCGG	660
AGTCGTGGGG GTGAGTGCAC TATTGAAGAA AACAGCGACA GAGCTACTTG TCGTTATTGG	720
TGCAAAGAGG ACATTCACGT TTCGAAGCTT ACGTTCCGAT GCAAAGTCGA GTACTATTCT	780
GTTTATGTAT TGTTCTTTGG CGGTATAGGA ATAGGTGGAG TTTTGGCGCT AAGATTTCTA	840
CTAGGAATTC CAATCTTGAT CGCAGCAGTG GTGTGGCAGT GCAAAAGACG GAATTTGCAT	900
ACATCCTCCG ATGAACAGAA CTGTTAA	927

< 2 1 0 > 配列番号 : 3

< 2 1 1 > 配列の長さ : 1 2 1 0

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : N i c o t i a n a t a b a c u m c v . X a n t h i
n c 葉

< 4 0 0 > 配列

```

TATATTCAAT TGAAAACATG TTGACAAGAG GGCTGCTTTT CGCTTGTGTT TTGTTACTTG   60
TGACACTCAT AAGCAGTTCT AAAGCGCAGG ATATTTCTCA ATGTGTCCCT TCTTCCTGCG   120
GTGATATTCA AATAAAATTT CCCTTCCGAC TGAGGACTGA TCCCGAGCAT TGTGGTAGAC   180
GCGGATATGA GCTCGATTGC CAGAACAACC AAACCGTGTT CAATTACAAA TCCAGAATTT   240
TCGACGTACA GGAAATTAAC TACAGAAGCT ACTCAATAAG GCTACTTGAT CCTGGCCTAA   300
ATGATCAGAG AGAAAATTGC ACAGTTTTTC CAAATCACAG GGCAAGTTAT GATGCCATGA   360
CTAGCCAAAT CTTTGAATGG GTTCGTGTTA ACAATGATAT CAACTATGTC AACTGTCTAG   420
CTCCTATCAA TTCGTCACAG TATATTCCTA CAAGTTTTTG TAGCAAAAAT TCAACGGGTT   480
TTAGCTACCT TGTCATAAGA GAAATATTGC AAGCTTCGGA TTTGGCTGGC GGCTGTAGGG   540
TTGAAACTGT TGCATGGTCC TCTGCTCCAG GCATTTTCATC AAACAAGTCG TCTACGTTAT   600
CAAGCACACA TCAAGGCCTG GCTTATGGGT TTGAGCTTTC TTGGAAGCGT AATCTGTTAT   660
GTAGAAATTG CGACCGGAGT CGTGGGGGTG AGTGCACTAT TGAAGAAAAC AGCGACAGAG   720
CTACTTGTCG TTATTGGTGC AAAGAGGACA TTCACGTTTC GAAGCTTACG TTCCGATGCA   780
AAGTCGAGTA CTATTCTGTT TATGTATTGT TCTTTGGCGG TATAGGAATA GGTGGAGTTT   840
TGGCGCTAAG ATTTCTACTA GGAATTCCAA TCTTGATCGC AGCAGTGGTG TGGCAGTGCA   900
AAAGACGGAA TTTGCATACA TCCTCCGATG AACAGAACTG TTAAGATTTT TGCTAGTCAA   960
GCTATTTTAA CAGAAGTTTG TGTATTTTTT TCAGAAAATC TAGGACAAGG TCAACCTGTG  1020
CTGGCGATTA ATTACTAGGA TTTTCTTTC CAGTTTAGTC CTGTATTTTA TTTGATATTC  1080
TTACCTATTT GATTGTGTAT GATTTTTTTC CTAAAATTT TATAATTTTC CTAATTCTTG  1140
TAAGTAATTG AATGGATATT TGTACTTTCT GTCAATAATA GAACAAGACA TTCGCAAAAA  1200
AAAAAAAAAA

```

1210

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、C7遺伝子の全塩基配列及び推定アミノ酸配列を示す図である。

【図2】

図2は、C7遺伝子産物の予想される機能領域と疎水性プロファイルを示すグラフである。

【図3】

図3は、レセプター様蛋白質であるLRK10と相同性のある領域のアミノ酸アラインメントを示す図である。

【図4】

図4は、C7-GFP融合蛋白質の細胞表面における発現を示す写真である。

【図5】

図5は、C7遺伝子mRNAの発現レベルの、傷害処理後の経時変化をノーザンブロッティングにより検出した写真である。

【図6】

図6は、C7遺伝子mRNAの発現レベルの、塩ストレス処理後の経時変化をノーザンブロッティングにより検出した写真である。

【図7】

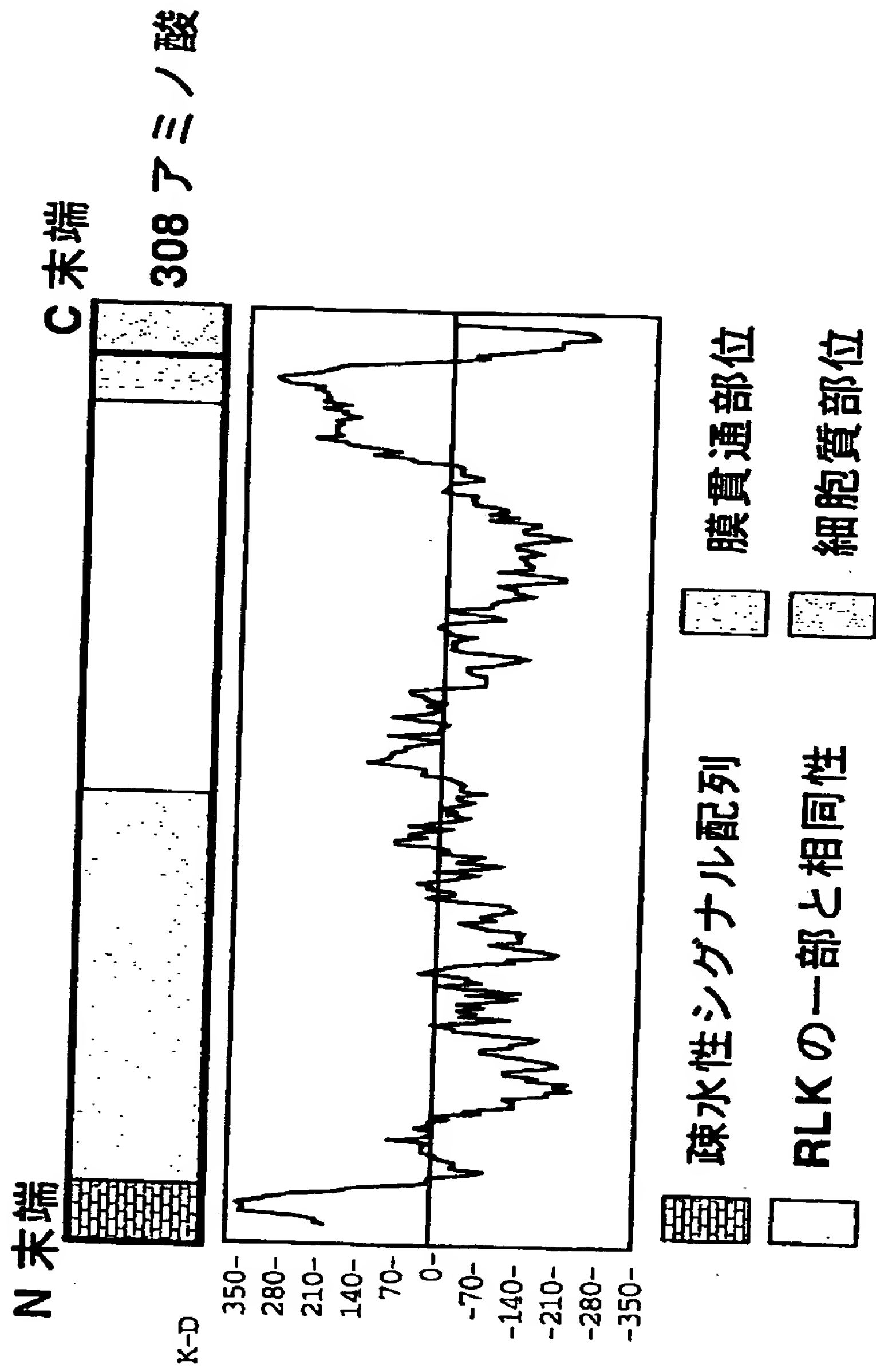
図7は、C7遺伝子mRNAの発現レベルの、浸透圧ストレス処理後の経時変化をノーザンブロッティングにより検出した写真である。

【書類名】 図面

【図 1】

90 TATATTCAAT TGAACAACATG TTGACAAGAG GGCTGCTTTT CGCTTGCTGT TTGTTACTTG TGACACTCAT AAGCAGTTCT AAAGCGCAGG
180 ATATTTCTCA ATGTGTCCTT TCTTCCTGCG GTGATATTCA AATAAAATTT CCCTTCGAC TGAGGACTGA TCCCGAGCAT TGTGGTAGAC
270 GCGGATATGA GCTCGATTGC CAGAACAAACC AAACCGTGT CAATTACAAA TCCAGAAATTT TCGACGTACA GGAAATTAAC TACAGAAGCT
360 ACTCAATAAG GCTACTTGAT CCTGGCCTAA ATGATCAGAG AGAAAATTGC ACAGTTTTC CAAATCACAG GGCAAGTTAT GATGCCCATGA
450 CTAGCCAAAT CTTTGAATGG GTTCGTGTTA ACAATGATAT CAACATATGC AACTGTCTAG CTCCTATCAA TTCGTCACAG TATATTCCTA
540 CAAGTTTTTG TAGCAAAAAT TCAACGGGTT TTAGCTACCT TGTCATAAGA GAAATATTGC AAGCTTCGGA TTGGCTGGC GGCTGTAGGG
630 TTGAAACTGT TGCATGGTCC TCTGCTCCAG GCATTTTCATC AAACAAGTCG TCTACGTTAT CAAGCACACA TCAAGGCTG GCTTATGGGT
720 TTGAGCTTTC TTGGAAGCGT AATCTGTTAT GTAGAAATTG CGACCGGAGT CGTGGGGTG AGTGCACTAT TGAAGAAAC AGCGACAGAG
810 CTACTTGTCG TTATTGGTGC AAAGAGGACA TTCACGTTTC GAAGCTTACG TTCCGATGCA AAGTCGAGTA CTATTCTGTT TATGTATTGT
900 TCTTTGGCGG TATAGGAATA GGTGGAGTTT TGGCGTAAG ATTCTACTA GGAATTCCTA TCTTGATCGC AGCAGTGGTG TGGCAGTGCA
990 AAAGACGGAA TTTGCATACA TCCTCCGATG AACAGAACTG TTAAGATTTT TGCTAGTCAA GCTATTTTAA CAGAAGTTG TGTATTTTTT
1080 TCAGAAATC TAGGACAAGG TCAACCTGTG CTGGCGATTA ATTACTAGGA TTTTCTTTC CAGTTAGTC CTGTATTTTA TTTGATATTC
1170 TTACCTATTT GATTGTGTAT GATTTTTTTC CTTAAATTTT TATAATTTTC CTAATCTCTG TAAGTAATTG AATGGATATT TGTACTTTCT
1210 GTCAATAATA GAACAAGACA TTCGCAAAAA AAAAAAAAAA

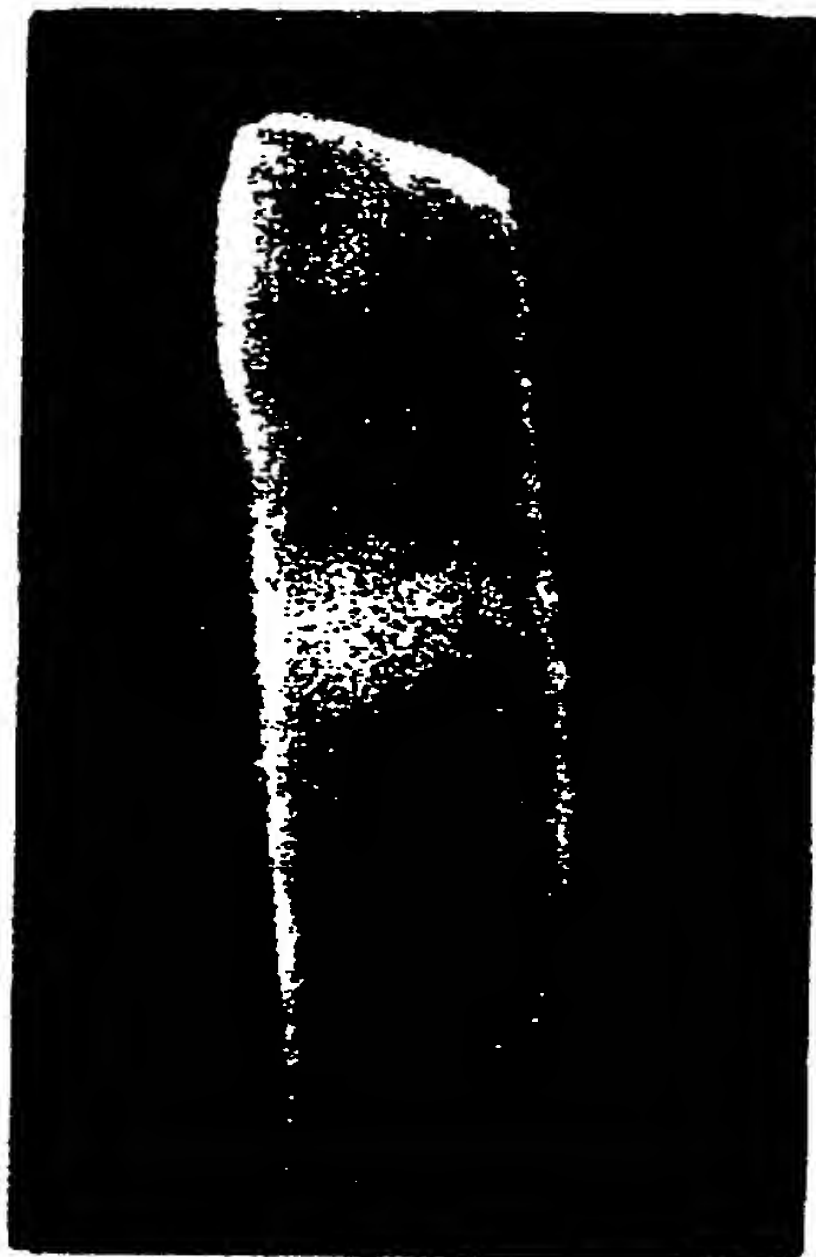
【図 2】



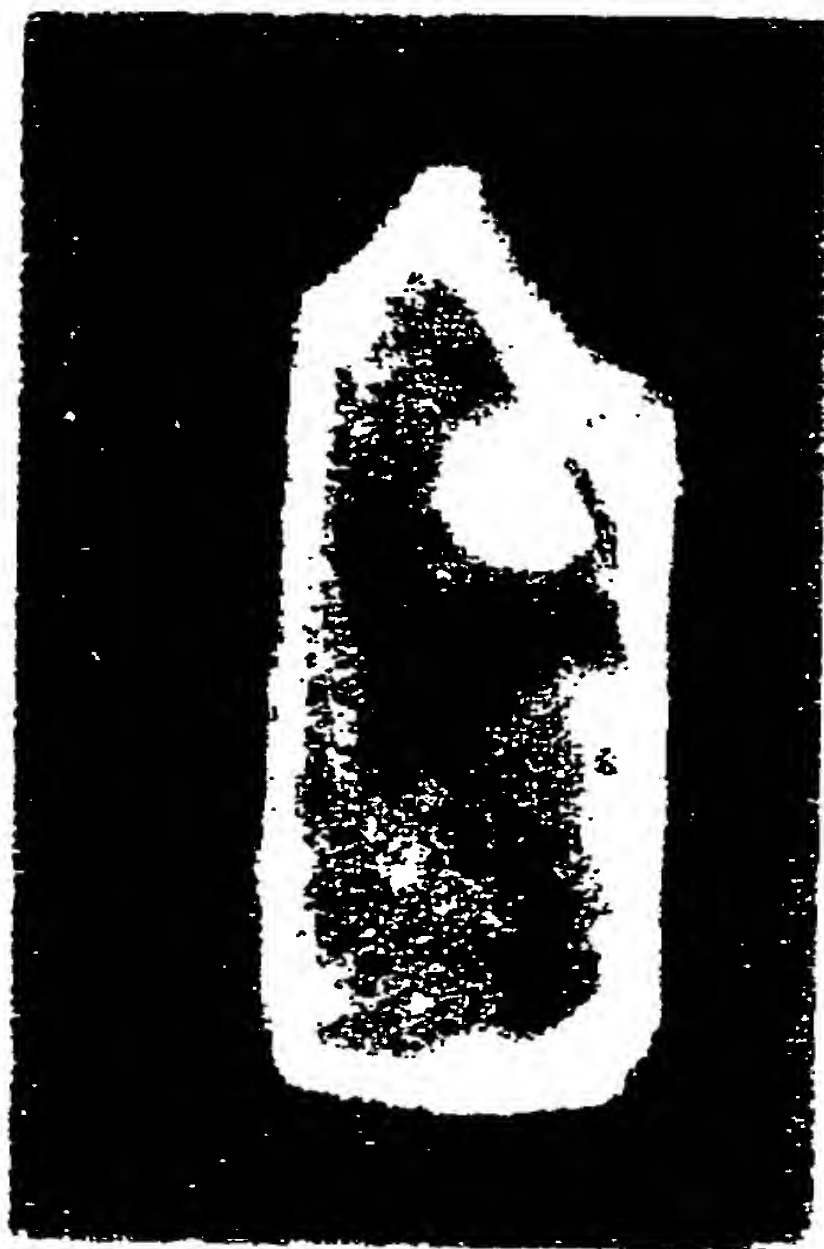
【図 3】

C7		SSKAQDISQC	MPSSC	--GDI	QIKFPFRIR	DPEHCGRCY	ETPCONNCA
LRK10 homolog 1		SDEADFFRNC	FPSRCSSDGP		LIKFPFRLES	SSSSCGAFCM	OLLSGQTL
LRK10 homolog 2		SDEADFFRNC	FPSRCSSDGP		LIKFPFRLES	SSSSCGAFCM	OLLSGQTL
C7		VFNYSRIFD	VQETINY	--R	SYSIRLDP	---GEN---	D QRENCHVFPN
LRK10 homolog 1		LLHHVLGLSK	VICIIYIYGV		INIVHAEWS	SQCANOKIIS	ANYSTSVYKQ
LRK10 homolog 2		LLHHVLGLSK	VTGIIYIYGV		INIVHAEWS	SQCANOKIIS	ANYSTSVYKQ
C7		HRASVDAMT	SOIEFWVRV		NNDINYVNC	APINSQAT	ETSECS
LRK10 homolog 1		YGFQVASLVS	CSEETWDST		DSIFGPTSC	SNASQSLYL	APYAFVS
LRK10 homolog 2		YGFQVASLVS	CSEETWDST		DSIFGPTSC	SNASQSLYL	APYAFVS

【図4】

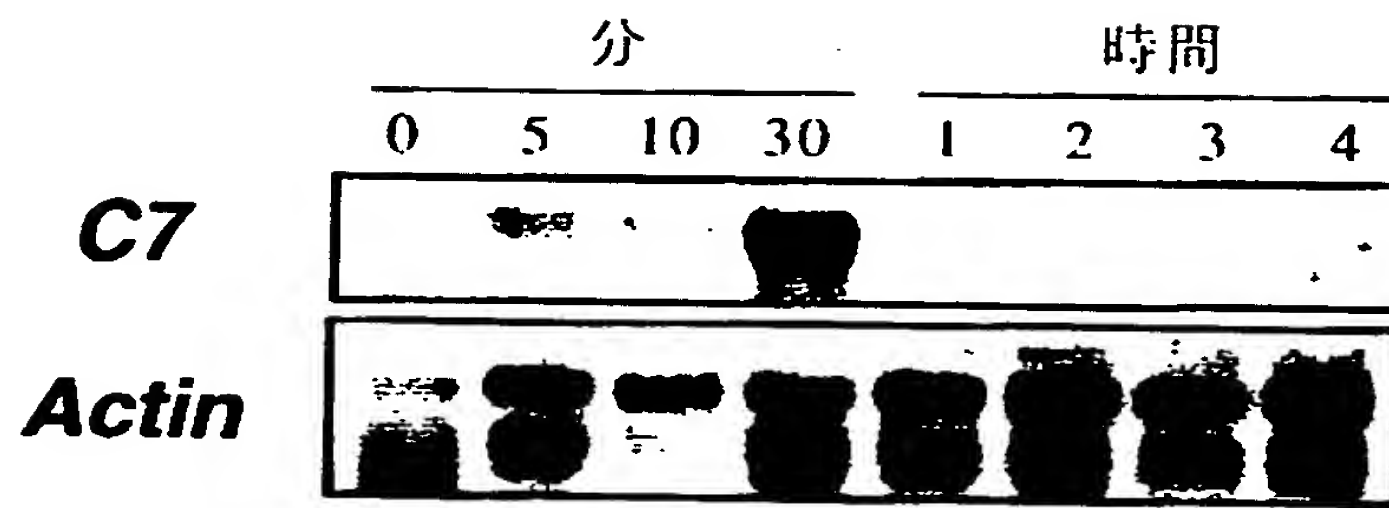


C7-GFP

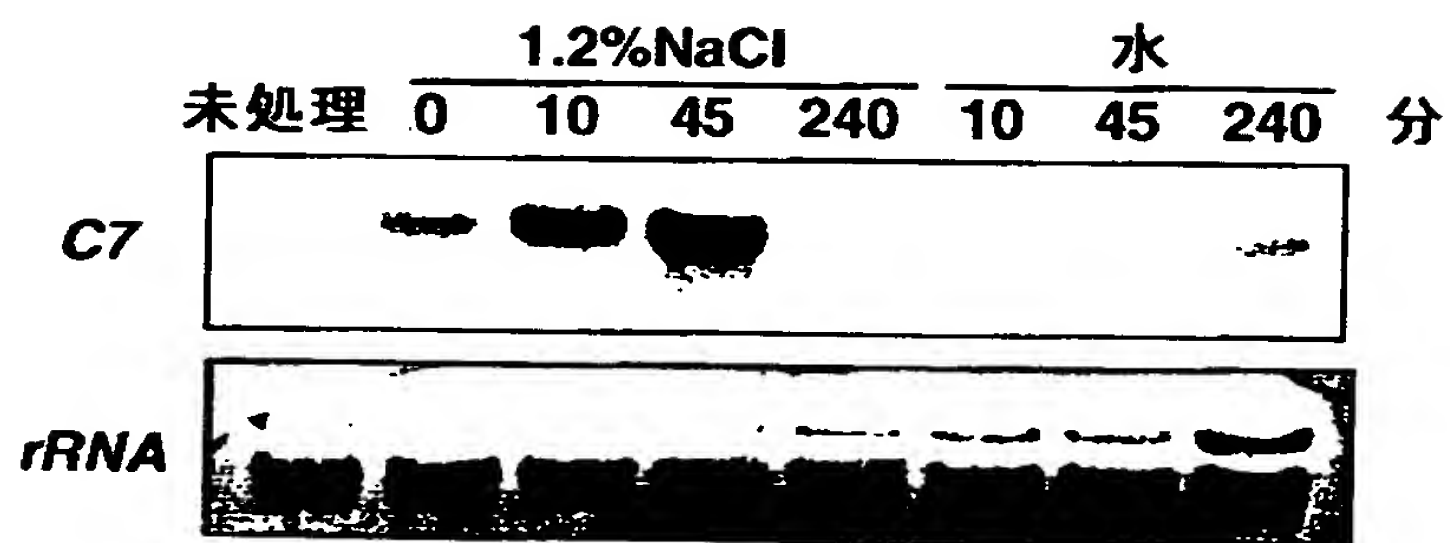


GFP

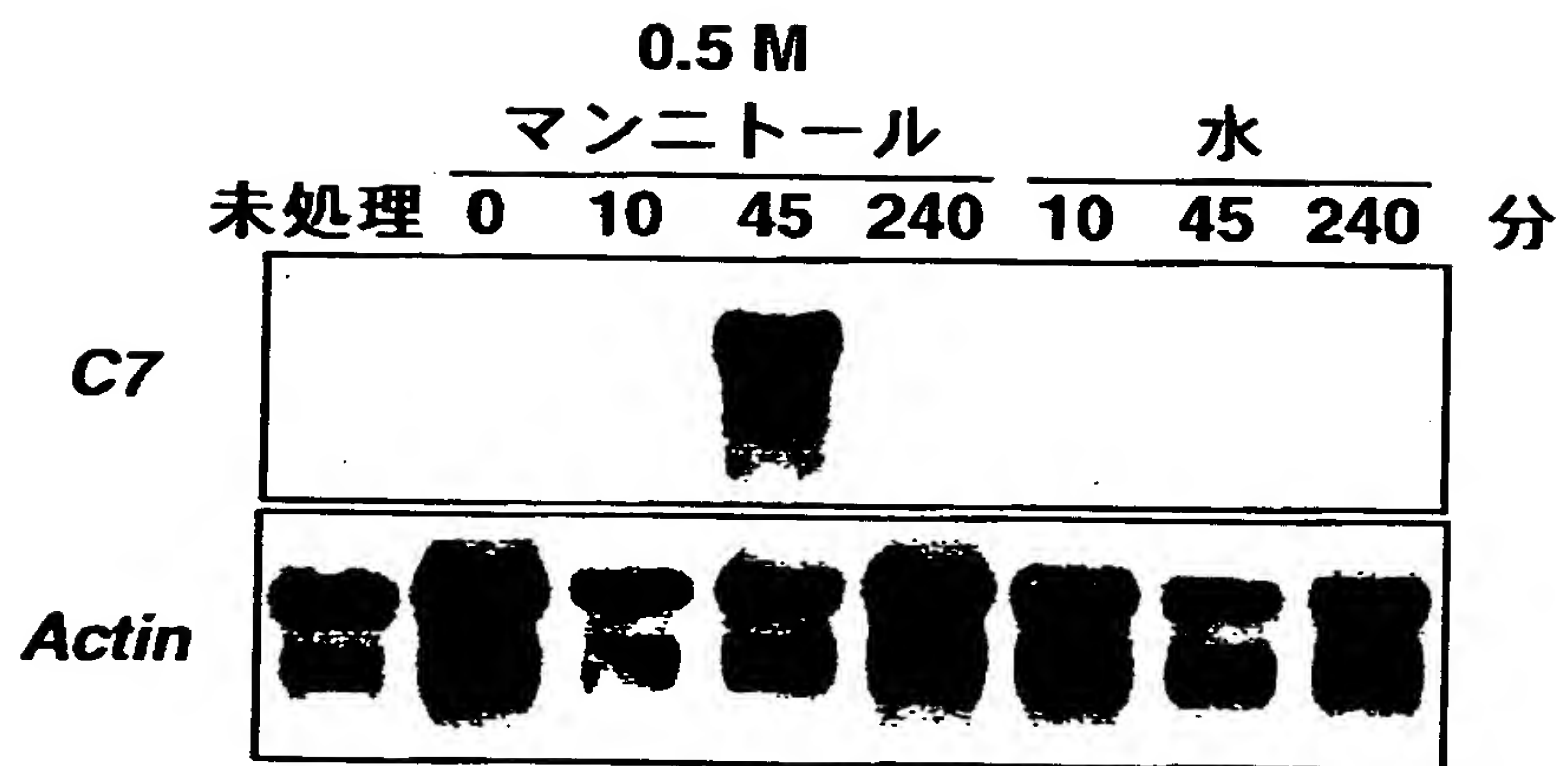
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 環境ストレスに強い植物を作出するために有効な、新規遺伝子を得る

。 【解決手段】 本発明により、傷害、浸透圧、塩又は低温ストレスに応答して発現し、レセプター様蛋白質をコードする、新規遺伝子であるC7遺伝子、及び当該遺伝子がコードするポリペプチドが与えられた。当該遺伝子を導入することにより、環境ストレスに強い植物を作出することが可能である。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-071655
受付番号	50000307651
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成12年 3月16日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	598169457
【住所又は居所】	奈良県生駒市高山町8916-5
【氏名又は名称】	奈良先端科学技術大学院大学長

【代理人】

申請人

【識別番号】	100059258
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
----------	------------------------

【氏名又は名称】	杉村 暁秀
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100072051
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
----------	------------------------

【氏名又は名称】	杉村 興作
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100098383
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3丁目2番4号 霞山ビル ディング7階 杉村萬國特許事務所内
----------	---

【氏名又は名称】	杉村 純子
----------	-------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598169457]

1. 変更年月日 1998年12月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 奈良県生駒市高山町8916-5

氏 名 奈良先端科学技術大学院大学長